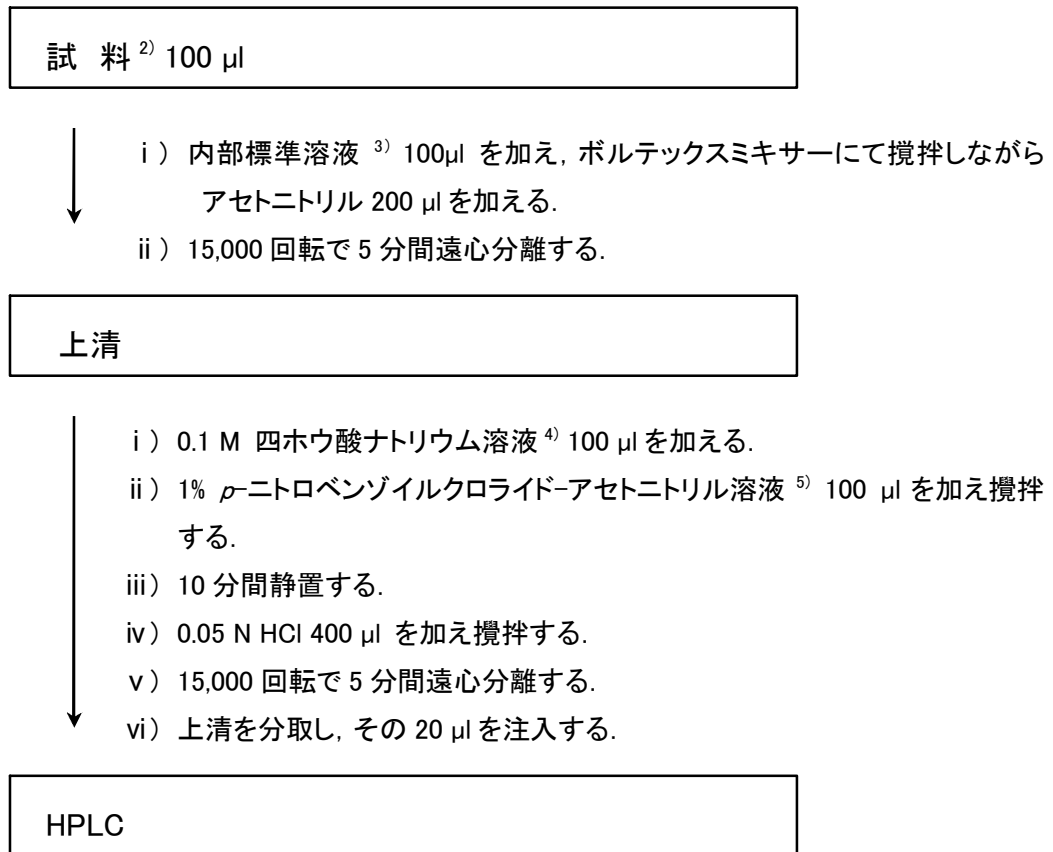


(2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

i) 前処理(抽出と誘導体化¹⁾)

【注 解】

- 1) *p*-Nitrobenzoyl chlorideにより*p*-ニトロ安息香酸誘導体を作成する。グリホサートとグルホシネートの誘導体は270 nm付近に吸収極大をもつ。
- 2) 試料は血液, 尿, 胃内容など。
- 3) 内部標準溶液は500 μ g/ml DL-2-amino-3-phosphonopropionic acid溶液を用いる。
- 4) 3.81 gの四ホウ酸ナトリウムを水に溶かして100 mlにする。
- 5) アセトニトリルはモレキュラーシーブなどで十分に脱水したものを用いる。溶液は用時調製する。

ii) HPLCの条件

装置	: 高速液体クロマトグラフ
検出器	: 紫外可視検出器
カラム	: XTerra MS C ₁₈ , 15 cm x 2.1 mm i.d., 粒径 3.9 μ m ¹⁾
カラム温度	: 40 °C
移動層	: アセトニトリル/20 mM リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 3.0) ²⁾ グラジエント ³⁾ 5 : 95 - (20 min) - 50 : 50 (保持, 5 min) - 5 : 95 (保持, 25 min)
流速	: 0.2 ml/min
測定	: 波長 270 nm ; 時間 50 min

【注 解】

- 1) カラムは逆相系の同等品で代替できるが、使用するカラムの種類により目的化合物や夾雑物のピークの溶出時間が異なるので、分析する前に標準物質とブランク試料を用いてピークの溶出時間を確認する必要がある。
- 2) リン酸二水素カリウム 2.72 gを1,000 mlのビーカーに入れ、水900 mlを加えて溶かす。攪拌しながらリン酸を滴下し、pHを3.0に調整する。これを1,000 mlのメスフラスコに移し、水でビーカーを洗浄しながら1,000 mlとする。
- 3) 本分析条件ではグリホサートとグルホシネートの溶出時間に大きく差があるためグラジエントをかけている。グラジエントを行わない場合、誘導体化試薬の分解物（*p*-ニトロ安息香酸）や副反応物（アンモニア、イソプロピルアミン）が長時間にわたって溶出してくるためカラムの洗浄操作を行わないと連続分析はできない。
- 4) グリホサートは血液、尿、胃内容に応用可能であるが、グルホシネートは血液では夾雑ピークの影響を受けるため分析できない。グルホシネートの代謝物である3-Methylphosphinopropionic acidは誘導体化されないため検出できない。グリホサートとグルホシネートの標準溶液での検出下限は0.1 µg/mlである。

表1. グリホサートとグルホシネートとそれぞれの代謝物および内部標準物質や関連物質の*p*-ニトロ安息香酸誘導体の保持時間

化合物	保持時間(分)
グリホサート	4.1
APPA	6.0
AMPA	6.9
グルホシネート	10.5
アンモニア	11.5
<i>p</i> -ニトロ安息香酸	15.6
イソプロピルアミン	18.7

APPA:DL-2-Amino-3-phosphonopropionic acid (内部標準物質)

AMPA:Aminomethyl phosphonic acid (グリホサート代謝物)

【文 献】

1. Hori Y et al. J Chromatogr B 2002; 767: 255 – 262.